

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 229—234, Mai 1971

Methoden der direkten Blutammoniakbestimmung ohne Destillation

Von A. ENGLHARDT, B. HAERTWIG, F. FRANKEN

Aus dem Zentrallaboratorium der 2. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. K. Oberdisse) der Universität Düsseldorf und dem Laboratorium der Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. G. A. Martini) der Universität Marburg/Lahn

(Eingegangen am 18. Dezember 1969 / 6. August 1970)

Folgende Methoden der direkten Ammoniakbestimmung im Vollblut wurden geprüft: kolorimetrische Bestimmung mit der Phenol-Hypochlorit-Reaktion in 2 Modifikationen und Bestimmung auf enzymatischem Weg mit 2-Oxoglutarat, NADH und Glutamatdehydrogenase.

Fehlerquellen aller Blutammoniakbestimmungen finden sich vor allem in den Teilschritten von der Blutentnahme bis zum Reaktionsansatz.

Bei der Phenol-Hypochlorit-Reaktion reagieren Aminosäuren in verschiedenem Ausmaß. Eine quantitativ meßbare Reaktion wird nur von Glycin, Leucin, sowie sehr hohen Konzentrationen von Glutamin gegeben. Eine Modifikation der Reaktion mit erhöhter Konzentration der Reagenzien ergab höhere Blutammoniakwerte aus denselben Blutproben als die Modifikation nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER.

Positive Korrelationen fanden sich für die enzymatische und die Phenol-Hypochloritmethode, sowie für die beiden Modifikationen der letzteren.

Die Wiederfindungsrate für die Messung von zugesetztem $\text{NH}_3\text{-N}$ zu Vollblut war 98—100% für die kolorimetrische Methode. Zwischen Extinktion bei 578 nm und $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalt der Standardlösung bestand eine streng lineare Beziehung.

Die Reproduzierbarkeit der beiden Methoden mit Phenol-Hypochlorit wurde durch Vielfachbestimmungen in der Serie und Doppelbestimmungen von Tag zu Tag geprüft. Der Variationskoeffizient für Bestimmungen in der Serie beträgt für die beiden Methoden 1,83 und 2,01%, für die Doppelbestimmungen 2,2 und 2,71%.

Eigene Untersuchungen ergaben eine gute Übereinstimmung der Werte der Phenol-Hypochlorit-Methode aus eigenen Untersuchungen mit den Werten von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER im Normbereich.

Methods for the direct determination of blood ammonia without distillation

In the present series of investigations the following methods were used for the direct determination of ammonia in whole blood: colorimetric determination by 2 modifications of the phenol-hypochlorite reaction and the enzymic determination with 2-Oxoglutarate, NADH and glutamic acid dehydrogenase.

The chief sources of error in all determinations of blood ammonia are located in the stages from the sampling of the blood to the analytical reaction mixture.

Amino acids react to varying extents in the phenol-hypochlorite reaction. Quantitatively measurable reactions are only given by glycine, leucine and by very high concentrations of glutamine. A modification of the reaction with increased concentrations of reagents gave higher blood ammonia values than the modification of MÜLLER-BEISSENHIRTZ and KELLER, using the same blood samples. There were positive correlations between the enzymic and the phenol-hypochlorite methods, and between the two modifications of the latter.

The colorimetric method showed a 89—100% recovery for $\text{NH}_3\text{-N}$ added to whole blood. There was a strict linear relationship between the extinction at 578 nm and the $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration of the standard solution.

The reproducibility of the two phenol-hypochlorite methods was tested by multiple determinations in series and by double measurements from day to day. V% in the series for the two methods was 1.83 and 2.01%, and for the double determinations 2.2% and 2.71%. Within the normal range, single determinations showed good agreement between values obtained by the phenolhypochlorite method and the values of MÜLLER-BEISSENHIRTZ and KELLER.

Ammoniakbestimmungen zur Diagnostik der Leberinsuffizienz wurden wegen der schwierigen und aufwendigen Methoden bisher in Routinelaboratorien kaum durchgeführt. Diese Methoden beruhten auf dem Prinzip, das $\text{NH}_4\text{-Ion}$ durch Alkalisieren in Ammoniak überzuführen (1, 13). In letzter Zeit sind Verfahren beschrieben worden, die eine direkte Bestimmung des Ammoniak in biologischem Material ohne Destillation erlauben. Eine Methode zur Bestimmung in Trichloroessigsäureextrakten wurde von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER (2) entwickelt. Hier wird Ammoniak mit Hilfe der BERTHELOschen Reaktion (3) nachgewiesen. Eine Modifikation wurde von BREUER (4) beschrieben. Eine weitere Möglichkeit ist die enzymatische Bestimmung nach Enteiweißung im neutralen Milieu unter

Zusatz von 2-Oxoglutarat und Glutamatdehydrogenase im optischen Test (5, 6).

Die Bewertung der Methoden ist unterschiedlich. SCHMIDT und SCHWARZ (6) geben an, daß die Hypochlorit-Phenolatmethode zwar einfacher in der Durchführung ist, aber Fehlerquellen hat, auf die im einzelnen nicht eingegangen wird.

In letzter Zeit wurde die diagnostische Bedeutung der Blutammoniakbestimmung wieder diskutiert, da die Entwicklung der Methoden der direkten Ammoniakbestimmung ihre Durchführung auch im Routinelaboratorium ermöglicht. In eigenen Untersuchungen wurden Ammoniakbestimmungsmethoden angewendet und geprüft, wobei Erfahrungen anderer Autoren berücksichtigt wurden (2, 7, 8, 9).

Methodik

Phenol-Hypochloritreaktion

Reagenzien

Phenol p. a. Merck; Dinatriumpentacyanonitrosylferrat Merck; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, Merck; NaOH in rotulis Merck; Natriumhypochlorit-Lösung (Merck) mit 13% aktivem Chlor. Die Prüfung des Gehalts an aktivem Chlor wurde nach der Methode von KELLER, MÜLLER-BEISENHIRTZ und NEUMANN (10) durchgeführt. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p. A. zur Herstellung der Eichlösungen. Die Herstellung der Lösungen für die Methode von MÜLLER-BEISENHIRTZ und KELLER erfolgte nach Angaben der Autoren (2).

Lösungen für die modifizierte Methode:

Lösung A: 20 g Phenol und 100 mg Dinatriumpentacyanonitrosylferrat werden getrennt gelöst, gemischt und mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Lösung B: 180 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ und 20 g NaOH werden getrennt gelöst und mit frischem dest. Wasser auf etwa 800 ml aufgefüllt. Nach Abkühlen im Eisbad Zusatz von 20 ml Natriumhypochloritlösung mit 4,5% Gehalt an aktivem Chlor (durch Verdünnung mit bidest. Wasser aus der 13proz. Lösung herstellen). pH dieser Lösung 12,6–12,9. Anschließend wird mit frischem bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Eichlösung: 4,72 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ werden mit frischem bidest. Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Diese Lösung enthält 100 mg/100 ml $\text{NH}_3\text{-N}$. Aus dieser Stammlösung werden Verdünnungen für Eichkurven und Standardlösungen hergestellt.

Durchführung der Bestimmung (2)

Etwa 1 ml Blut wurde in einer 1 ml-Mikroliterspritze abgezogen und sofort 0,5 ml in ein Gefäß mit 0,5 ml eisgekühlter 10proz. (w/v) Trichloressigsäure bzw. Trichloressigsäure-NaOH-Lösung (10 g Trichloressigsäure + 1,3 g NaOH ad 100 ml bidest. Wasser) gegeben. Es wurden jeweils 2–3 Ansätze in dieser Weise durchgeführt. Die Gefäße (Plastikgefäße zum Mikrolitersystem Eppendorf) wurden sofort gut geschüttelt und der Niederschlag in der Zentrifuge zum Mikrolitersystem abzentrifugiert. Aus jedem Gefäß wurden 0,5 ml des klaren Überstands mit 2 ml Phenolreagenz und 2 ml Hypochloritreagenz gemischt und 30 Min. bei 37° inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Extinktionen am Photometer Eppendorf abgelesen ($d = 1 \text{ cm}$, $\lambda = 578 \text{ nm}$). Für die Modifikation der Methode mit Hypochlorit wurden 0,5 ml des klaren Überstands mit 6 ml Lösung A (Phenollösung) und 6 ml Lösung B (Hypochloritlösung) gemischt und wie oben inkubiert. Die Ablesung erfolgte wie oben bei 578 nm, aber Schichtdicke 2 cm.

Bei jeder Messung wird in beiden Methoden Leerwert und ein Standardwert (200 $\mu\text{gN}/100 \text{ ml}$) mitgeführt.

Berechnung:

$$\frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}} \cdot 200 = \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml Blut}$$

Enzymatische Bestimmung

Die Bestimmung auf enzymatischem Weg wurde nach der von SCHMIDT und SCHWARZ (6) angegebenen Methode durchgeführt, die in einigen Punkten modifiziert wurde (s. u.).

Die kinetische Messung wurde stets unmittelbar an die Enteiweißung angeschlossen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß die Ammoniakneubildung in den sauren Extrakten in den einzelnen Blutproben in verschiedenem Umfang stattfindet. SCHMIDT und SCHWARZ haben empfohlen, in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Blutentnahme und Bestimmung mit Hilfe eines Korrekturfaktors auf die Ammoniakkonzentration zum Zeitpunkt t_0 zu schließen. In eigenen Untersuchungen gelang es aber nicht, einen für alle Blutproben gültigen Korrekturfaktor zu finden, da die Ammoniakbildungsrate zu unterschiedlich war.

Eine Schwierigkeit der Methode war, daß die Reaktion nicht immer, wie angegeben, nach 40 Min. beendet war, sondern in einen kontinuierlichen „Schleich“ überging. Der eigentliche Endwert mußte durch Extrapolation gewonnen werden. Es war

daher erforderlich, die Kinetik über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, was mit größerem Zeitaufwand verbunden war. Auch war die angegebene Enzymmenge nicht immer ausreichend, um die Reaktion in der angegebenen Zeit zum vollständigen Ablauf zu bringen.

Ergebnisse

Fehlerquellen der Methoden

Die größten Fehlermöglichkeiten der Ammoniakbestimmung liegen in den Teilschritten von der Blutentnahme bis zur eigentlichen Messung. Bereits CONWAY und Mitarbeiter (1, 12–14) beschrieben eine Ammoniakneubildung in Blutproben in vitro aus verschiedenen Quellen, vor allem aus Adenosin, ATP und AMP. Auch der Glutamin-N-Spiegel des Blutes liegt fast 200fach höher als der des $\text{NH}_3\text{-N}$ (16, 17).

Es wurde daher immer wieder versucht, durch Extrapolieren den in vivo-Ammoniakspiegel des Blutes zu ermitteln. CONWAY und COOKE (13) ermittelten auf diese Weise, daß das strömende Blut Gesunder kein Ammoniak enthält. Dagegen sprechen die von einer Reihe von Autoren ermittelten $\text{NH}_3\text{-N}$ -Bildungsraten, die zwischen 5 und 35 $\mu\text{g}/\text{Std} \cdot 100 \text{ ml}$ Blut liegen. Eigene Ergebnisse stimmen mit diesen Werten überein (Tab. 1). Das bedeutet, daß unter Annahme eines

Tab. 1
 $\text{NH}_3\text{-N}$ -Bildungsrate in $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Blut · Std. bei Aufbewahrung der Blutproben, bzw. der enteiweißten Extrakte
Werte nach Angaben verschiedener Autoren und eigene Ergebnisse

Untersuchungsmaterial	Temperatur [°C]	n	$\text{NH}_3\text{-N}$ -Bildungsrate $\mu\text{g}/100 \text{ ml} \cdot \text{Std.}$	Autoren
a) Aufbewahrung des Nativbluts				
Vollblut	20–22		5,10–34,8	MÜLLER-BEISENHIRTZ u. KELLER (2)
Vollblut	0		60,0	CONWAY u. COOKE (11)
Vollblut	0		42,0	KIRK (23)
Vollblut	0		18,0	SELIGSON u. HIRAHARA (21)
Vollblut	0		10,1	FORMAN (20)
Vollblut	0		5,5	MILLER u. RICE (22)
Vollblut	0	12	15,6	eigene Untersuchungen
b) Aufbewahrung der tiefgefrorenen Probe nach Einfrieren in flüssiger Luft				
Vollblut tiefgefroren		2	0,11	eigene Untersuchungen
c) Aufbewahrung der enteiweißten Extrakte				
Trichloressigsäure-Extrakt	0	8	19,0–88,0	eigene Untersuchungen
Extrakt: Vollblut/10proz. Trichloressigsäure 1:1	0	5	15,0–34,0	eigene Untersuchungen
Extrakt: Vollblut/10proz. Trichloressigsäure + 1,3% NaOH 1:1	0	5	4,0–30,0	eigene Untersuchungen
Vollblut/10proz. Trichloressigsäure 1:1 dazu 6,65proz. K_3PO_4 3,0 ml zu 5,0 ml Extrakt				

linearen Anstiegs der Blutammoniakwerte in vitro ein Spiegel von 60 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ frühestens 2 Stdn. nach der Entnahme erreicht werden kann. Wir haben durch fortlaufende Ammoniakbestimmungen aus einer Blutprobe den Verlauf der Ammoniakneubildung verfolgt und die Kurve gegen t_0 extrapoliert (Abb. 1). Es ergab sich ein in vivo-Wert von im Mittel 68 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ im

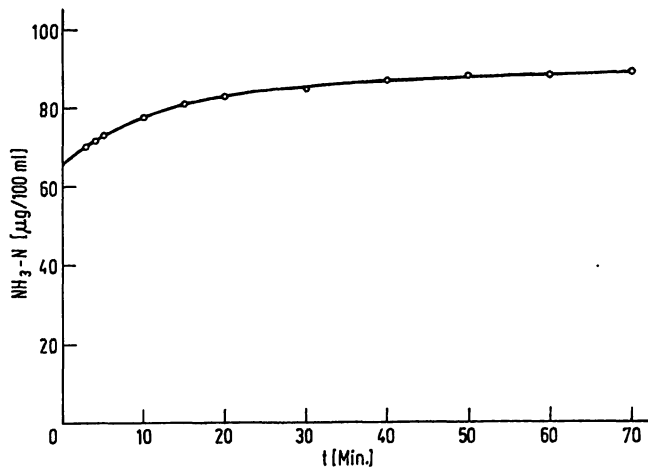


Abb. 1

NH₃-N-Bildungsrate im Vollblut

Blutentnahmen aus einer Blutprobe in Abständen bis zu 70 Min. Aufbewahrung der Probe während des Versuchs bei + 4°. Enteiweißung (0,5 ml Blut + 0,5 ml 10proz. Trichloressigsäure eisgekühlt) sofort nach Entnahme, Zentrifugieren 2 Min., Zentrifuge des Mikrolitersystems Eppendorf. Anschließend Reaktionsansatz (siehe Methodik). Die erhaltene Kurve wurde nach t_0 extrapoliert.

Blut. Derselbe Wert wurde gewonnen, wenn eine Blutprobe (0,5 ml) sofort nach der Entnahme in flüssige Luft gebracht wurde und anschließend die Enteiweißung durch Zusatz von 0,5 ml 10proz. Trichloressigsäure, wie in der Methodik beschrieben, durchgeführt wurde.

Enteiweißung

Da sowohl im sauren wie im alkalischen Milieu eine nicht enzymatische Desaminierung stattfindet, schreitet die Ammoniakneubildung auch nach Enteiweißung weiter fort. Im sauren Trichloressigsäuremilieu ist die NH₃-N-Bildungsrate sogar höher als im Vollblut (Tab. 1). KELLER und Mitarbeiter (10) verwenden daher zur Enteiweißung eine Trichloressigsäurelösung, die zur Hälfte mit NaOH neutralisiert ist. In eigenen Untersuchungen wurde der Umfang der NH₃-N-Neubildung nach Enteiweißung in verschiedenen Extrakten geprüft. Im Trichloressigsäureextrakt war sie von Probe zu Probe sehr unterschiedlich (10–78%/Std., im Mittel 38%/Std.). Durch Zusatz von NaOH konnte die Zuwachsrate auf 16–28%/Std., im Mittel 22%/Std. gesenkt werden. Die besten Ergebnisse erhielten wir, wenn die Fällung zunächst mit Trichloressigsäure vorgenommen wurde und unmittelbar danach die Neutralisation mit K₃PO₄ durchgeführt wurde (Zuwachsrate 3–25%/Std., im Mittel 15%/Std. (Abb. 2). Der ursprüngliche NH₃-N-Gehalt wurde dabei gleich 100% gesetzt.

Phenol-Hypochloritreaktion

Die meisten Verfahren der kolorimetrischen Ammoniakbestimmung im Blut bedienen sich der Phenol-Hypochlorit-Reaktion (BERTHELORESCHE Reaktion). Die Reaktion ist, wie bereits die ersten Untersucher (17,3) nachweisen konnten, keineswegs spezifisch für Ammoniak, da Aminosäuren, vor allem Glycin, ebenfalls mit Farbentwicklung reagieren. Nach LANGHELD (18)

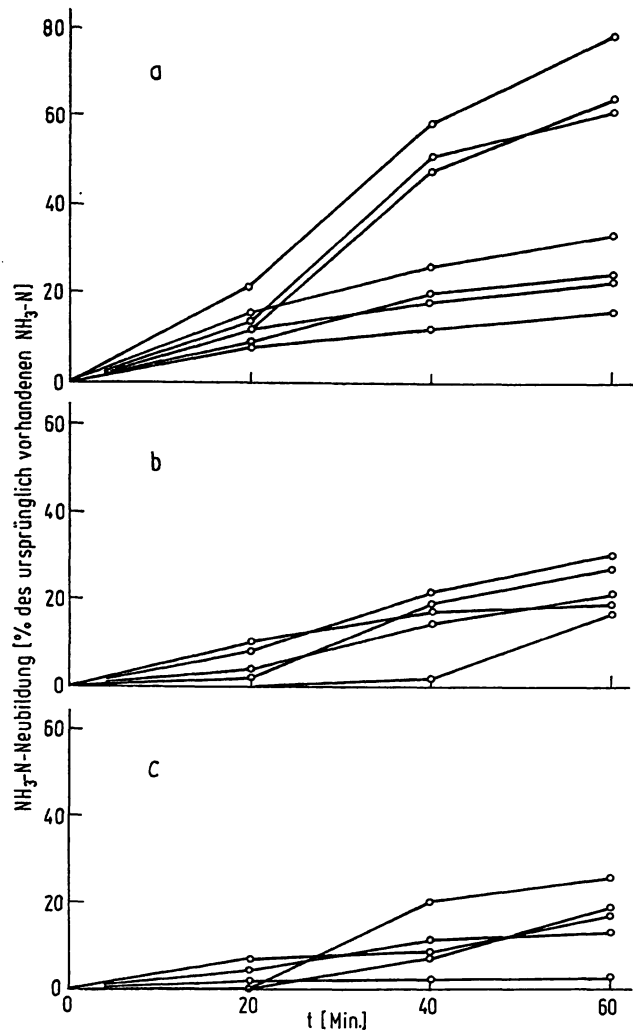


Abb. 2

NH₃-N-Bildung in eiweißfreien Extrakten aus menschlichem Vollblut
a) Blut/10proz. Trichloressigsäure 1:1. b) Blut/10proz. Trichloressigsäure + 1,3% NaOH. c) Blut/10proz. Trichloressigsäure, neutralisiert mit 6,65proz. K₃PO₄ · 3 H₂O; 5 + 3 (v/v)

Tab. 2a

Phenol-Hypochlorit-Reaktion mit Vollblut mit und ohne Zusatz Stickstoffhaltiger Substanzen

Die Substanzen wurden dem Vollblut sofort nach der Entnahme zugesetzt. Endkonzentration im Blut siehe Tabelle. Unmittelbar im Anschluß daran Enteiweißung mit 10proz. Trichloressigsäure und Durchführung der Phenol-Hypochlorit-Reaktion nach MÜLLER-BEISENHIRTZ und KELLER

NH₃-N-Gehalt der Blutprobe ohne Zusatz = 100proz.

Zusatz	Endkonzentration der zusammen- gesetzten Substanzen im Blut (mg/100 ml)	Anstieg bzw. Abfall des NH ₃ -N Kontrolle = 100 %
Ohne Zusatz	—	100,0
Harnstoff	30,0	102,4
Harnstoff	60,0	105,2
Harnsäure	2,0	101,3
Harnsäure	20,0	105,3
Glycin	2,0	105,0
Glycin	4,0	116,4
Alanin	4,0	98,3
Alanin	40,0	97,4
Leucin	2,0	120,5
Leucin	4,0	128,8
Glutamin	6,0	106,8
Glutamin	60,0	117,8
Kreatinin	10,0	105,0
ATP	40,0	98,2
NADH	2,0	103,5
0,9proz. NaCl	—	98,2

werden α -Aminosäuren durch Hypochlorit zu Aldehyden abgebaut, wobei der Stickstoff der Aminogruppe als Ammoniak in Freiheit gesetzt wird. Bei Überschuß von Hypochlorit setzt sich Ammoniak weiter zu

Tab. 2b
Phenol-Hypochlorit-Reaktion bei verschiedener Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur
Methode nach MÜLLER-BEISENHIRTZ und KELLER. Messung von Vollblutproben und Ammoniumsulfat-Standardlösungen

Probe	Inkubationsdauer (Min.)	Inkubationstemperatur [°C]	E_{578}	Farbentwicklung
Vollblut	30	37	0,114	blaugrün
	15	60	0,087	grün
	5	95	0,069	gelb
Vollblut	30	37	0,124	blaugrün
	15	60	0,089	grün
	5	95	0,061	gelb
Vollblut	30	37	0,200	blaugrün
	15	60	0,156	grün
	5	95	0,154	grün
Standard 200 µg/100 ml	30	37	0,220	blaugrün
	15	60	0,242	blaugrün
	5	95	0,250	blaugrün
Standard 200 µg/100 ml	30	37	0,200	blaugrün
	15	60	0,220	blaugrün
	5	95	0,248	blaugrün

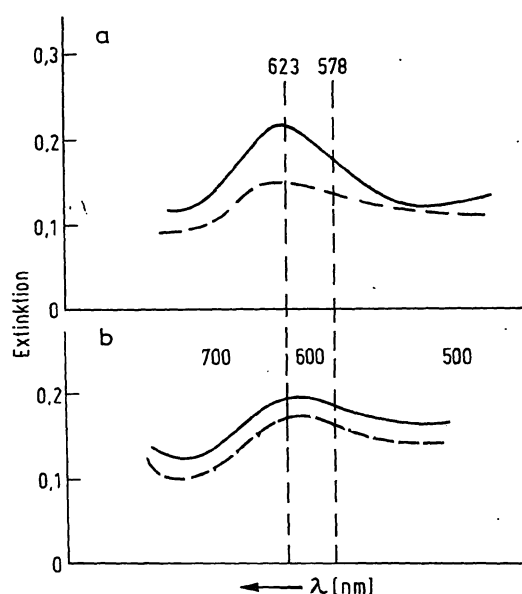


Abb. 3a

Änderung der Absorption durch Variation des Testansatzes
Phenol-Hypochlorit-Reaktion — Standard 100 µg/100 ml — — —
Blut. a) Methode nach MÜLLER-BEISENHIRTZ und KELLER (2).
b) Modifikation der Methode (siehe Methodik)

Chloramin um, wobei freier Stickstoff entsteht (19). Die Farbreaktion wird also durch die Hypochloritkonzentration im Ansatz stark beeinflusst. Aber auch die Inkubationsdauer ist von Bedeutung. Nach FORMAN (20) stören Aminosäuren nur bei langer Inkubationszeit. In eigenen Untersuchungen fanden wir, daß außer Aminosäuren auch Nucleotide die Reaktion beeinflussen, daß aber eine wesentliche Reaktion nur durch Glycin, Leucin und hohe Konzentrationen von Glutamin hervorgerufen wird (Tab. 2a). In noch höheren Konzentrationen wird die Farbentwicklung der BERTHELOTSchen Reaktion durch Aminosäuren gehemmt (7, 10). Eine Verkürzung der Inkubationsdauer bei gleichzeitiger Erhöhung der Reaktionstemperatur brachte keine günstigeren Ergebnisse. Die Farbentwicklung des Standards wurde nicht beeinflusst, die der Probe aber stark gestört durch Entstehung gelblicher Farbtöne, wahrscheinlich durch Mitreaktion weiterer unbekannter Substanzen (Tab. 2b).

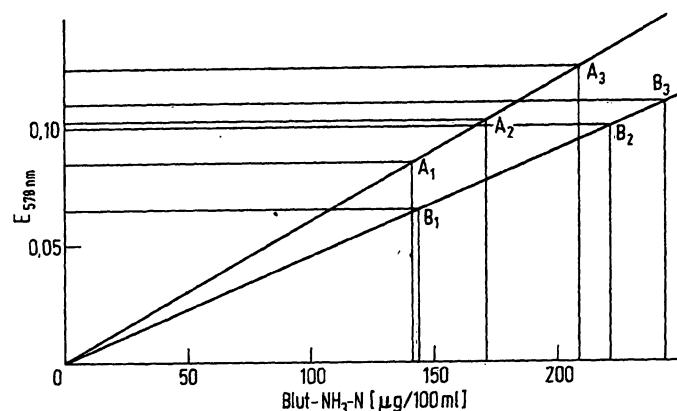


Abb. 3b

NH₃-N-Bestimmung im Vollblut mit 2 Modifikationen der Phenol-Hypochlorit-Reaktion
Die graphische Ermittlung des Blut-NH₃-N-Werts aus 3 Blutproben, der mit den beiden Modifikationen bestimmt wurde, erfolgte durch direkte Ablesung aus den zugehörigen Eichkurven

Ansatz A: Reagenzien:

Phenol-Reagenz: 10 g Phenol-50 mg Dinatriumpentacyanonitrosylferrat auf 1 l
Hypochlorit-Reagenz: 90 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O + 10 g NaOH + 3,8 ml 13proz. Hypochloritlösung auf 1 l

Ansatz B: Reagenzien:

Phenol-Reagenz: 20 g Phenol + 100 mg Dinatriumpentacyanonitrosylferrat auf 1 l
Hypochlorit-Reagenz: 180 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O + 20 g NaOH + 20 ml 4,5proz. Hypochloritlösung auf 1 l

Für A und B:
0,5 ml Trichloressigsäure-Blut-Gemisch 1:1, 2,0 ml Phenol-Reagenz, 2,0 ml Hypochlorit-Reagenz

Blut-NH₃-N:

A₁ 141 µg/100 ml B₁ 145 µg/100 ml
A₂ 170 µg/100 ml B₂ 223 µg/100 ml
A₃ 210 µg/100 ml B₃ 244 µg/100 ml

Auch durch Änderungen der Konzentrationen im Reaktionsansatz wurden Standard und Probe nicht in gleicher Weise beeinflusst. Erhöht man die Hypochloritkonzentration, so nimmt die Farbintensität des Standards ab (eigene Versuche). Möglicherweise wird in der Probe die Freisetzung des Stickstoffs aus Ammoniak durch andere Faktoren gehemmt. Erhöht man auch die Konzentration an Phenol und Dinatriumpentacyanonitrosylferrat, erhält man höhere Ammoniakwerte im Blut, da die Farbentwicklung des Standards stärker absinkt als die der Probe (Abb. 3a und b).

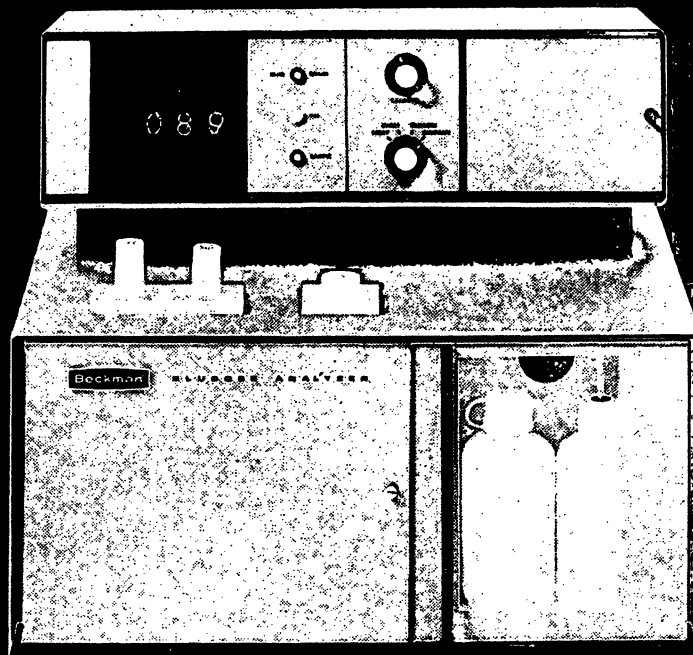
Zuverlässigkeitskontrolle

Die Prüfung der Richtigkeit der Ammoniakwerte ist schwierig, da wegen der Variabilität des Standards eine Eichung über einen Extinktionskoeffizienten nicht möglich ist. Daher wurden die Werte der kolorimetrischen Methode mit den auf enzymatischem Weg gewonnenen Werten verglichen. Es ergab sich eine Korrelation der beiden Methoden ($r = 0,74$), jedoch keine absolute Übereinstimmung der Werte (Abb. 4). Ein Vergleich der beiden Modifikationen der Phenol-Hypochlorit-Reaktion zeigt ebenfalls bei ausreichender Korrelation Abweichungen vor allem im oberen Bereich, wobei die Modifikation der Methode mit höheren Konzentrationen an Phenol und Hypochlorit höhere Werte ergab.

Die Reproduzierbarkeit der Methoden wurde durch Vielfachbestimmungen in der Serie und durch Doppelbestimmungen von Tag zu Tag geprüft. Vielfachbestimmungen aus Extrakten verschiedener Blutproben

Wie lange dauert bei Ihnen eine wahre Glukose-Bestimmung?

Wir benötigen nur 10 Sekunden ...



... mit dem neuen **Beckman-Glukose-Analysator Modell ERA-2001**
durch Anwendung einer völlig neuen Meßtechnik.

Unser Gerät ermittelt die wahre Glukose durch polarographische Messung der Abnahmegeschwindigkeit des Sauerstoffs während der enzymatischen Oxydation.

Weitere überzeugende Argumente:

- Mikroliter-Proben
10 µl Serum oder Plasma bzw. 50 µl Urin
- Ohne Enteiweißung oder Probenverdünnung

- Digitale Anzeige der Meßwerte in mg % Glukose
- Meßgenauigkeit $\pm 2\%$
Linearität der Anzeige bis 400 mg %
- Außerordentlich günstiger Preis



BECKMAN INSTRUMENTS GMBH
8 München 45, Frankfurter Ring 115, Tel. 3 88 71, Telex 05-23823

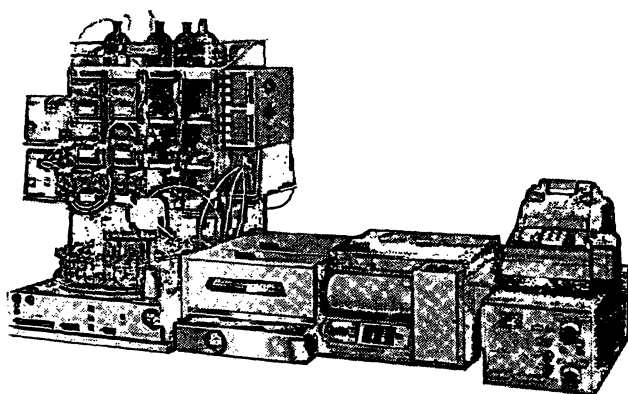
Technische Büros: Berlin, Tel. 3 12 10 35; Hamburg, Tel. 51 95 54; Hannover, Tel. 66 39 92; Düsseldorf, Tel. 68 44 93; Frankfurt, Tel. (06103) 10 03; Stuttgart, Tel. 71 18 37; München, Tel. 88 50 35
Internationale Niederlassungen: Fullerton/USA, Genf, Paris, Glenrothes/Schottland, Tokio, Kapstadt, Wien, Amsterdam, Stockholm

Automation Ihres Laboratoriums!

Eine Notwendigkeit!

Begegnen Sie dem
Arbeitskräftemangel und wählen Sie

MECOLAB M

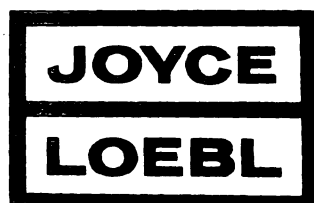


eines unserer Geräte zur Automation Ihres Laboratoriums.

Dieses Gerät gestattet:

- Automatische Durchführung mikrobiologischer Analysen (z. B. Bestimmung von Folsäure, Vitamin B₆ und B₁₂)
- Analyse von Probenchargen bis zu 40 Proben
- Mischung von Gesamtblut vor der Probenahme
- Erneute Suspendierung biologischer Substanzen vor der Photometrierung
- Möglichkeiten der zweimaligen oder dreimaligen Messung von Proben
- Analysengeschwindigkeit von 3 Proben pro Minute
- Methodenwechsel innerhalb von Minuten

Durch MECOLAB M werden unsere bewährten automatischen Analysensysteme MECOLAB C für klinisch-chemische Routineanalysen und MECOLAB E für Enzymkinetik um ein weiteres System bereichert.



JOYCE-LOEBL

Gerätetechnik GmbH

7769 Kalkofen · Romhalden · Telefon 07557/380

Gastrokamera- Untersuchung

Grundlagen

Untersuchungstechnik, Bildbeurteilung, Ergebnisse
mit den Referaten des Ersten Gastrokamera-Seminars,
13.—15. Juni 1969, Berlin

**Herausgegeben
von Dozent Dr. H. Oshima**

Gastprofessor an der Freien Universität Berlin, Nippon-Ika-Universität Tokyo,
Präsident der European Association for Gastrokamera Diagnosis,
unter Mitarbeit von Dr. W. BERGEMANN, Berlin

Oktav. VIII, 146 Seiten. Mit 33 Abbildungen. 1971.
Kartiert DM 20,—

Die Gastrokamera-Untersuchung, ein schnelles, einfaches und beschwerdearmes Verfahren zur intragastralen farbigen Fotografie für die Magen-Diagnostik hat in Europa in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung erlangt.

Vom 13.—15. 6. 1969 wurde das *Erste Gastrokamera-Seminar* im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin veranstaltet.

Die verschiedenen Gastrokamera-Modelle, die Untersuchungstechnik und besonders die Beurteilungsmethode sowie -kriterien wurden als Schwerpunkte behandelt.

Durch die Berichte der verschiedenen Untersucher aus 6 europäischen Ländern wurde der derzeitige Stand der Gastrokamera-Diagnostik in Europa dargelegt.

Die etwa 300 Teilnehmer aus 9 europäischen Ländern bewiesen das rege Interesse an dieser Untersuchungsart.

An einer weiter zunehmenden Bedeutung dieses diagnostischen Verfahrens ist bei der Häufigkeit von Magenkrankungen, insbesondere des Magenkrebses nicht zu zweifeln. Dazu soll die Herausgabe dieser Verhandlungsberichte als Leitfaden der Gastrokamera-Untersuchung beitragen.



**Walter de Gruyter
Berlin · New York**

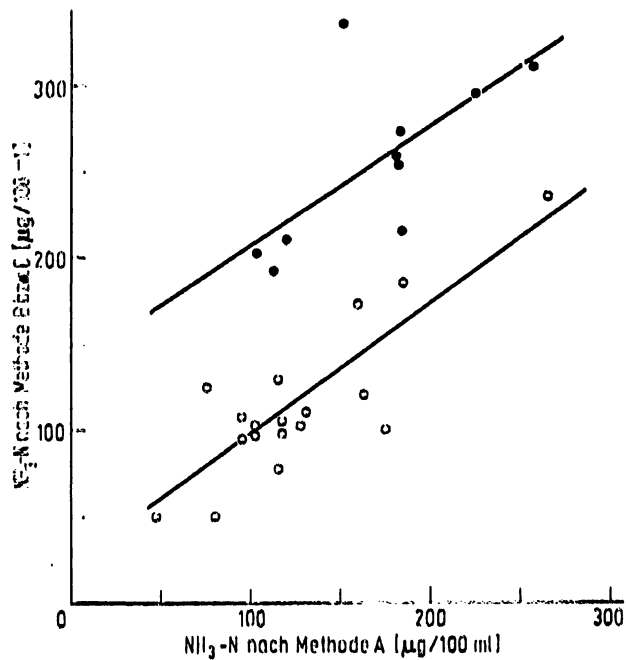


Abb. 4

$\text{NH}_3\text{-N}$ -Bestimmung im Vollblut. Korrelation von Werten, die mit verschiedenen Methoden gewonnen wurden

A Phenol-Hypochlorit-Reaktion nach MÜLLER-Brissenhirtz und KELLER (2)

B Modifizierte Phenol-Hypochlorit-Reaktion (siehe Methodik)

C Enzymatische Bestimmung nach SCHMIDT und SCHWARZ (6)

B/A (•): $y = 139,87 \pm 0,08x$ $r = 0,9805$

C/A (•): $y = 20,02 \pm 0,764x$ $r = 0,7423$

ergaben für die Methode nach MÜLLER-Brissenhirtz und KELLER einen Variationskoeffizienten von 1,83%, für die Modifikation einen Wert von 2,01% (Tab. 3). Die Wiederfindungsrate von zugesetztem $\text{NH}_3\text{-N}$ zu Blut betrug für die kolorimetrische Methode (nach MÜLLER-Brissenhirtz und KELLER (2)) 98–100%. Für dieselbe Methode bestand eine streng lineare Beziehung zwischen $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration der Standardlösung und Extinktion bei 578 nm (Tab. 4, Abb. 5).

Normwerte

Die in der Literatur angegebenen Normwerte, die mit der Mikrodifusion nach CONWAY gewonnen wurden, liegen zwar in derselben Größenordnung, differieren aber erheblich in bezug auf die obere Normgrenze (Tab. 5). Es ist nicht sicher zu entscheiden, ob unterschiedliche Behandlung der Blutproben oder Gebrauch

von Modifikationen die Ursache ist. Eigene Normwerte wurden unter Ausschaltung aller möglichen Fehlerquellen ($\text{NH}_3\text{-N}$ -Neubildung in vitro) gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte am nüchternen Patienten bei

Tab. 3
Qualitätskontrolle der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Bestimmung mit der Phenol-Hypochlorit-Reaktion

Probe Nr.	n	Methode nach MÜLLER-Brissenhirtz u. KELLER	Modifizierte Methode
		\bar{x} s V%	\bar{x} s V%
10fach-Bestimmungen aus 5 verschiedenen Blutproben			
1	10	205 1,0 0,03	311 4,7 1,61
2	10	173 3,4 1,07	217 4,1 1,80
3	10	154 4,0 2,00	300 8,2 2,05
4	10	213 4,0 1,88	100 3,0 1,53
5	10	144 2,0 1,39	162 4,7 3,00
		\bar{x} 1,83	\bar{x} 2,01
20 Doppelbestimmungen aus Blutproben, die an verschiedenen Tagen entnommen wurden			
1–20	20	175 4,0 2,20	200 5,7 2,71

Tab. 4
Wiederfindung zugesetzter Mengen $\text{NH}_3\text{-N}$ zu Blutproben. Ammoniakbestimmung mit der Phenol-Hypochloritreaktion nach MÜLLER-Brissenhirtz und KELLER

Blut- $\text{NH}_3\text{-N}$ (µg/100 ml)	zugesetzte Menge $\text{NH}_3\text{-N}$ (µg/100 ml)	$\text{NH}_3\text{-N}$ eingesetzt (µg/100 ml)	$\text{NH}_3\text{-N}$ wiedergefunden (µg/100 ml)	(%)
08	100	108	200	101
08	200	208	300	100,7
08	300	308	300	100,2
08	400	408	400	98,4
08	600	608	600	98,4
08	800	808	802	99,3

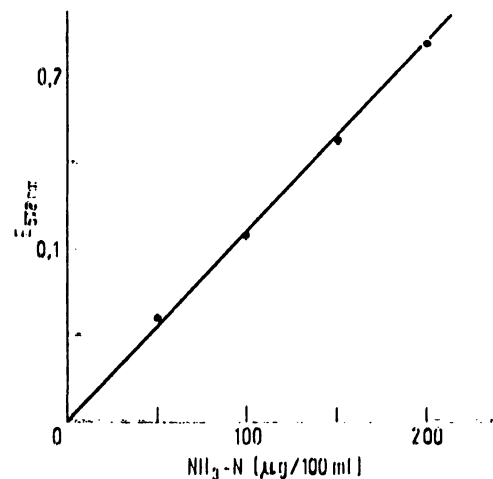


Abb. 5

Markung von Verdünnungsreihen einer Ammoniumsulfat-Lösung, 4,72 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 1 l bildet. Wasser = 100 mg $\text{NH}_3\text{-N}/100$ ml

Tab. 5
Normwerte der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Bestimmung im Vollblut (venös)

Methode	n	Mittelwert \bar{x} (µg/100 ml)	Streuung ($\bar{x} \pm 2s$)	Autor
Mikrodifusion nach CONWAY	100	70,5	74,4–84,8	CALKINS (24)
Mikrodifusion nach CONWAY	31	?	00–200	LEHMANN u. Mitarbeiter (2b)
Mikrodifusion nach CONWAY	122	?	44–180	ZIMMERMANN u. Mitarbeiter (20)
Mikrodifusion nach CONWAY	40	44,0	10–78	RIBBIN, STRUPNICKI u. WEWALKA (27)
Mikrodifusion nach CONWAY	23	120	20–180	TRAPANI, GAMBETTA, BELLUCCI u. DAVIDSON (28)
Mikrodifusion nach CONWAY	10	52,2	37,5–80,0	ZÖLLNER u. BIRK (29)
Mikrodifusion nach CONWAY	83	41,0	10,0–73,2	THÜLEN u. BORNHARDT (30)
Mikrodifusion nach CONWAY	22	57	20–87	STROHMAYER (31)
Phenol-Hypochlorit-Reaktion	10	47,1	32–85	MÜLLER-Brissenhirtz u. KELLER (32)
Phenol-Hypochlorit-Reaktion	35	59,0	29,8–90,2	eigene Untersuchung Methode nach MÜLLER-Brissenhirtz u. KELLER (2)
Phenol-Hypochlorit-Reaktion	16	97,0	50,8–138,4	eigene Untersuchungen modifiz. Phenol-Hypochlorit Reaktion
Enzymat. Methode	?	?	30–80	SCHMIDT u. SCHWARZ (6)
Enzymat. Methode				
Männer	120	62	20–110	MORINO u. Mitarbeiter (32)
Frauen	80	75	30–130	
Enzymat. Methode	15	80,7	22,0–150,5	eigene Untersuchungen, Methode nach SCHMIDT u. SCHWARZ (6)

völliger Körperruhe, nach mindestens 12stdg. Nahrungskarenz. Die Werte, die mit der Methode nach MÜLLER-BEISENHIRTZ und KELLER gewonnen wurden, stimmen gut mit den Normwerten der Autoren überein. Sie sind bei exakter Einhaltung aller Versuchsbedingungen als reproduzierbare Normwerte, die den Messungen zugrundegelegt werden können, zu betrachten. Höhere Normwerte fanden wir in Übereinstimmung mit MÜTING und Mitarbeitern (Tab. 5) für die enzymatische Methode (NH_3 -N-Neubildung während der Reaktion?) und für die Modifikation der Phenol-Hypochloritreaktion.

Besprechung der Ergebnisse

Wie die Untersuchungen von KELLER und Mitarbeitern (2, 10), sowie von SCHMIDT und SCHWARZ (6) gezeigt haben, können mit den direkten Verfahren der Ammoniakbestimmung im Blut reproduzierbare Werte gewonnen werden.

Da die aufwendige und störanfällige Diffusion nach CONWAY nicht mehr erforderlich ist, sind die neuen Methoden einfacher zu handhaben und erlauben Untersuchungen an einem größeren Patientengut auch im Routinelaboratorium. Richtige Werte werden aber nur erhalten, wenn alle Fehlerquellen der Methoden beachtet werden. Die wesentlichsten Fehlermöglichkeiten betreffen die Teilschritte von der Probenentnahme bis zum Reaktionsansatz. Die Ammoniakneubildung in vitro, die sowohl im Nativblut als auch in enteiweißten Extrakten stattfindet, führt zu falsch hohen Werten. Sie läßt sich auch durch sofortige Neutralisation der sauren Extrakte nicht völlig verhindern. Es ist daher erforderlich, den Reaktionsansatz sofort im Anschluß an die Enteiweißung durchzuführen. Nach eigenen Erfahrungen beträgt die Zeitspanne von der Blutentnahme bis zum Ansatz bei optimalen Arbeitsbedingungen maximal 5–6 Min. Unter diesen Bedingungen beträgt der Fehler durch Ammoniakbildung in vitro etwa 2%.

Eine Fehlerquelle der kolorimetrischen Methoden, die sich der Phenol-Hypochlorit-Reaktion bedienen, ist die Freisetzung von Ammoniak aus Aminosäuren (3, 18, 20) und die Bildung von freiem Stickstoff aus Ammoniak durch das Hypochloritreagenz selbst (19). Der Umfang der Störung ist abhängig sowohl von der Struktur der Aminosäuren als auch von der Hypochloritkonzentration im Test (3). Unter den gegebenen Testbedingungen spalten Aminosäuren nur einen sehr geringen Anteil ihres Stickstoffs ab, lediglich Glycin führt bereits in physiologischen Konzentrationen zu einer Verstärkung der Farbstoffbildung. Es muß aber auf jeden Fall darauf geachtet werden, daß der Gehalt der Hypochloritlösung an aktivem Chlor konstant gehalten wird und der Arbeitsvorschrift (10) genau entspricht.

Unterschiedliche Normwerte können durch Modifikation der Phenol-Hypochlorit-Methode bedingt sein. In eigenen Untersuchungen konnten wir zeigen, daß zwei Modifikationen dieser Methode zwar nur gering unterschiedliche Normwerte ergeben, daß aber die Korrelation der Werte besonders im oberen Bereich nicht optimal ist. Auch die Werte der enzymatischen Methode stimmen mit denen des kolorimetrischen Verfahrens im hohen Bereich nicht immer überein. Die enzymatische Methode, die frei von solchen Störungen ist, erfordert Übung und Kenntnisse enzymatischer Vorgänge, da der Endpunkt der Reaktion auch bei optimalem Einsatz an NADH und Glutamatdehydrogenase nicht immer einwandfrei zu erkennen ist.

Die Untersuchungen zeigen, daß auch die neuen Methoden der Blutammoniakbestimmung weiterer Verbesserung bedürfen. Eine wesentliche Verbesserung stellt die neuerdings von KELLER empfohlene Mikrobestimmung im Kapillarblut dar, die auch die Fehlerquellen der Ammoniakneubildung berücksichtigt (10). Ob die mit dieser Methode gewonnenen Werte dem klinischen Bild besser entsprechen als diejenigen des venösen Bluts, wäre zu überprüfen.

Literatur

1. CONWAY, E. J., *Biochem. J.* 29, 2755 (1935). — 2. MÜLLER-BEISENHIRTZ, W. und H. KELLER, *Klin. Wschr.* 43, 43 (1965). — 3. FÜRTH, O., A. FRIEDRICH und R. SCHOLL, *Biochem. Z.* 240, 50 (1931). — 4. BREUER, H., Persönliche Mitteilung. — 5. KIRSTEN, E., C. GEREZ und R. KIRSTEN, *Biochem. Z.* 337, 312 (1963). — 6. SCHMIDT, F. H. und M. SCHWARZ, *Klin. Wschr.* 591, 44 (1966). — 7. MÜLLER-BEISENHIRTZ, W., *Z. analyt. Chem.* 272, 145 (1965). — 8. CHANEY, A. L. und E. P. MARBACH, *Clin. Chem. (New York)*, 8, 130 (1962). — 9. SEARCY, R. L., G. S. GOUGH, J. L. KROTZER und L. M. BERGQUIST, *Amer. J. Med. Technol.* 27, 255 (1961). — 10. KELLER, H., W. MÜLLER-BEISENHIRTZ und E. NEUMANN, *Klin. Wschr.* 45, 314 (1967). — 11. CONWAY, E. J. und R. COOKE, *Biochem. J.* 33, 457 (1939). — 12. CONWAY, E. J. und R. COOKE, *Nature (London)*, 142, 720 (1938). — 13. CONWAY, E. J., *Microdiffusion. Analysis and volumetric error*. 3rd Edition, Crosby, Lockwood and Son, London (1950). — 14. CONWAY, E. J., *Microdiffusion. Analysis and volumetric error* 4th, revised ed., Crosby, Lockwood 81 td. London, (1957). — 15. SEEGMILLER, J. E., R. SCHWARTZ und C. S. DAVIDSON, *J. clin. Invest.* 33, 984 (1954). — (16. KREBS, H. A., L. V. EGGLESTONE und R. HEMS, *Biochem. J.* 44, 159 (1949), zit. nach Brown R. H., Duda G. D., Korkes, S. und Ph. Handler, *Arch. Biochem. Biophysics* 66, 301 (1957). — 17. ENGEL, R., zit. nach (3). — 18. LANGHELD, R., zit. nach (3). — 19. RASCHIG, zit. nach (3). — 20. FORMAN, D. T., *Clin. Chem. (New York)* 10, 496, (1964). — 21. SELIGSON, D. und HIRAHARA, K., *J. Laborat. Clin. Med. S. Louis*, 49, 962 (1957). — 22. MILLER, G. E. und J. D. RICE, *Amer. J. Clin. Path.* 39, 97 (1963). — 23. KIRK, W., *Acta med. scand. Suppl.* 77, 1, (1936). — 24. CALKINS, A., *J. Laborat. Clin. Med. S. Louis*, 47, 343 (1956). — 25. EISEMAN, B., W. BAKWELL und G. CLARK, *Amer. J. Med.* 20, 87 (1956). — 26. ZIMMERMANN, H. J. und R. J. KORN, *Amer. J. Med. Sci.* 231, 177 (1956). — 27. RISSEL, STEFANELLI und WEWALKA, *Wien. Klin. Wschr.* 69, 172 (1957). — 28. TRAEGER, GABUZDA, BALLOU und DAVIDSON, *Metabolism* 3, 99 (1954). — 29. ZÖLLNER, N. und H. BIRK, *Klin. Wschr.* 36, 12 (1958). — 30. THÖLEN H. und R. BOSSHARDT, *Klin. Wschr.* 36, 574 (1958). — 31. STROHMAYER, G., *Verhandl. internat. Kongreß f. Innere Medizin, München 1962, Verhandlungsband Stuttgart* (1963). — 32. MÜTING, D., J. HEINZE, J. REIKOWSKI und G. BETZIEN, *Clin. Chim. Acta Amsterdam*, 19, 391 (1968).

Frau Prof. Dr. A. Englhardt, 355 Marburg/Lahn, Mannkopfstr. 1